

jp08269087/pn

L2 ANSWER 1 OF 1 JAPIO COPYRIGHT 2003 JPO
ACCESSION NUMBER: 1996-269087 JAPIO
TITLE: NEW TETRAPEPTIDE AND PENTAPEPTIDE, THEIR PRODUCTION
AND ANTIHYPERTENSIVE CONTAINING THE SAME AS ACTIVE
INGREDIENT
INVENTOR: YAMAUCHI FUMIO; SUETSUNA KUNIO
PATENT ASSIGNEE(S): YAMAUCHI FUMIO
PATENT INFORMATION:

| PATENT NO | KIND | DATE | ERA | MAIN IPC |
|-------------------|------|----------|--------|------------|
| ----- | | | | |
| ***JP 08269087*** | A | 19961015 | Heisei | C07K005-10 |

APPLICATION INFORMATION

STN FORMAT: JP 1992-96112 19920302
ORIGINAL: JP04096112 Heisei
PRIORITY APPLN. INFO.: JP 1992-96112 19920302
SOURCE: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN (CD-ROM), Unexamined
Applications, Vol. 1996
INT. PATENT CLASSIF.:
MAIN: C07K005-10
SECONDARY: A61K038-00; C07K007-06

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain new tetrapeptide and pentapeptide having angiotensin converting enzyme-inhibiting activities and useful for the therapy of essential hypertension, etc., as antihypertensives by separating and purifying them from the decomposition product solution of soybeans with a protease.

CONSTITUTION: The new peptides comprise respectively three kinds of tetrapeptides having L-amino acid sequence peptide structures of formulas I-III and five kinds of pentapeptides having L-amino acid sequence peptide structures of formulas IV-VIII. These new peptides have angiotensin converting enzyme-inhibiting activities and are useful for the therapy of essential hypertension, etc., as antihypertensives. The oligopeptides are obtained by treating soybeans with a protease, filtering the obtained product, allowing the filtrate to pass through a semi-permeable membrane, successively fractionating the passed ingredients by a strong acidic cation exchange resin treatment, a gel filtration, an ion exchange gel filtration, and a reverse phase high performance liquid chromatography in order, and subsequently separating the peptides respectively from angiotensin transferase-inhibiting active fractions fractionated in the above respective treatments.

COPYRIGHT: (C)1996, JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-269087

(43) 公開日 平成8年(1996)10月15日

| (51) Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|-------|---------|---------------|--------|
| C 0 7 K 5/10 | Z N A | 8517-4H | C 0 7 K 5/10 | Z N A |
| A 6 1 K 38/00 | A B U | 8517-4H | 7/06 | |
| C 0 7 K 7/06 | | | A 6 1 K 37/02 | A B U |

審査請求 有 請求項の数 3 書面 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平4-96112

(22) 出願日 平成4年(1992)3月2日

(71) 出願人 591273502

山内 文男

宮城県仙台市太白区桜木町31-11

(72) 発明者 山内 文男

宮城県仙台市太白区桜木町31-11

(72) 発明者 末綱 邦男

山口県下関市川中本町16-14

(54) 【発明の名称】 新規なテトラペプチド、ペンタペプチドその製法およびそれらを有効成分とする血圧降下剤

(57) 【要約】

【目的】 大豆のタンパク質分解酵素の分解液から新規な血圧降下作用を有するペプチドを提供する。

【構成】 大豆をタンパク質分解酵素等で処理し、アンジオテンシン変換酵素阻害活性を有する新規な3種類のテトラペプチド、5種類のペンタペプチドを単離した。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次式；Gln-Val-Val-Phe, Ile-Thr-Pro-Leu, Val-Val-Phe-Asp, Gly-Asp-Ala-Pro-Asn, Ile-Val-Phe-Asp-Ala, Val-Gln-Val-Val-Phe, Gly-Glu-Leu-Phe-Glu, Val-Thr-Val-Pro-Gln

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規な3種類のテトラペプチドと5種類のペンタペプチド。

【請求項2】 大豆をタンパク質分解酵素で処理して得られた生成物を濾過し、その濾液成分中の半透膜を通過した成分を順次、強酸性陽イオン交換樹脂、ゲル濾過、イオン交換性ゲル濾過、逆相高速液体クロマトグラフィーによって分画し、その処理毎に得られた分画からアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有する成分を含有する分画を得ることを特徴とする請求項1の新規な3種類のテトラペプチドと5種類のペンタペプチドの製法。

【請求項3】 請求項1の新規な3種類のテトラペプチドと5種類のペンタペプチドから選ばれた1種類以上のテトラペプチドあるいはペンタペプチドを有効成分とする血圧降下剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なテトラペプチド、ペンタペプチドを有効成分とする血圧降下剤およびその新規なテトラペプチド、ペンタペプチドの製法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 高血圧は、病因的に血圧上昇の原因が明らかなもの（病候性高血圧）と不明なもの（本態性高血圧）とに大別されている。病候性高血圧は原因となる疾患を治癒させることで高血圧を治癒させることができるが、本態性高血圧では原因に対する直接的な治療法は困難である。従来、レニン-アンジオテンシン系（以下、R・A系と略記する。）は、本態性高血圧の重要な要因の一つであると考えられており、ここ10年来、R・A系で中心的な役割を果たしているアンジオテンシン変換酵素（以下、ACEと略記する。）の活性を阻害することによってR・A系を調節して本態性高血圧を調節する試みが行われてきた。そのようなACE活性阻害を有する物質としては、合成化合物の場合にはL-プロリン誘導体 [N. A. Ondetti, B. Rubin et al; Science, 196, 441 (1977)] やそれをベースにした化合物が知られており、天然物由来の物質の場合には蛇毒由来のブラディキニン増強因子（C末端がPro） [S. H. Ferreira, D. C. Bartelt et al; Biochem

2

istry, 9, 3583 (1970)]、ゼラチンのコラゲナーゼ消化物由来の6種類のペプチド（C末端がAla-Hyp） [G. Oshima, H. Shimabukuro et al; Biochim. Biophys. Acta, 566, 128 (1979)]、牛カゼインのトリプシン消化物由来のペプチド（C末端がGly-Lys） [S. Maruyama, H. Suzuki; Agric. Biol. Chem, 46, 1393 (1982)] などが知られている。食品の場合には鈴木らが大豆、茶類、貝類、果実類などでACE活性阻害を認めている [鈴木健夫、石川宣子；農化, 57, 1143 (1983)]。しかし、これら天然物由来の物質はいずれも静脈内投与で効果が確認されているのみで、経口投与による薬理効果は不明であり、発明されてから長期間経過しているが、未だ医薬品としての開発が進んでいるとの報告はない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、新規なテトラペプチド、ペンタペプチド、その製法およびそれを有効成分とする血圧降下剤を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明は、前記の課題を解決するために鋭意研究した結果、大豆のタンパク質分解酵素の分解液から得られた本発明の新規なテトラペプチド、ペンタペプチドが、血圧降下作用を有することを見出し本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、

(1) 次式； Gln-Val-Val-Phe, Ile-Thr-Pro-Leu, Val-Val-Phe-Asp,

Gly-Asp-Ala-Pro-Asn, Ile-Val-Phe-Asp-Ala, Val-Gln-Val-Val-Phe, Gly-Glu-Leu-Phe-Glu, Val-Thr-Val-Pro-Gln

で示されるL体のアミノ酸配列を有する新規な3種類のテトラペプチドと5種類のペンタペプチド。

(2) 大豆をタンパク質分解酵素で処理して得られた生成物を濾過し、その濾過成分中の半透膜を通過した成分を順次、強酸性陽イオン交換樹脂、ゲル濾過、イオン交換性ゲル濾過、逆相高速液体クロマトグラフィーによって分画し、その処理毎に得られた分画からアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有する成分を含有する分画を得ることを特徴とする前記の新規な3種類のテトラペプチドと5種類のペンタペプチドの製法。

(3) 前記の新規なテトラペプチド、ペンタペプチドを有効成分とする血圧降下剤に関するものである。

【0005】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明の新規なテトラペプチド、ペンタペプチドは、

次式； Gln-Val-Val-Phe, Ile-Thr-Pro-Leu, Val-Val-Phe-As

3

P
Gly-Asp-Ala-Pro-Asn, Ile-V
al-Phe-Asp-Ala,
Val-Gln-Val-Val-Phe, Gly-
Glu-Leu-Phe-Glu,
Val-Thr-Val-Pro-Gln

(以上3種類のテトラペプチド、5種類のペンタペプチドの式中の各記号はペプチド化学におけるアミノ酸配列の各アミノ酸単位を示す。)で示されるL体のアミノ酸配列を有する新規なテトラペプチド、ペンタペプチドであり、この常温における性状は白色粉末である。

【0006】前記の新規なテトラペプチド、ペンタペプチドの製法としては、そのテトラペプチド、ペンタペプチドを化学的に合成する方法または大豆のタンパク質分解酵素の分解液から分離、精製する方法を挙げることができる。本発明の新規なテトラペプチド、ペンタペプチドを化学的に合成する場合には、液相法または固相法などの通常の合成方法によって行うことができるが、好ましくは、固相法によってポリマー性の固相支持体へ前記テトラペプチド、ペンタペプチドのC末端側(カルボキシル末端側)からそのアミノ酸残基に対応したL体のアミノ酸を順次ペプチド結合によって結合して行くのが良い。そして、そのようにして得られた合成テトラペプチド、合成ペンタペプチドは、トリフルオロメタンスルホン酸、フッ化水素などを用いてポリマー性の固相支持体から切断した後、アミノ酸側鎖の保護基を除去し、逆相系のカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(以下、HPLCと略す。)などを用いた通常の方法で精製することができる。

【0007】本発明の新規なテトラペプチド、ペンタペプチドを、大豆のタンパク質分解酵素の分解液から分離精製することができるが、その場合には1992年度日本農芸化学会大会(東京)講演要旨集P34講演番号2Ga9の方法に準拠し、例えば以下のようにして行うことができる。上記の新規なテトラペプチド、ペンタペプチドを含有している大豆を取り出して、ホモゲナイザーを用いて適当な溶媒(例えば、水、トリス-塩酸緩衝液、リン酸緩衝液などの中性の緩衝液など)中で十分にホモジネートした後、加水分解する。加水分解は常法に従って行う。例えば、ペプシン等のタンパク質分解酵素で加水分解する場合は、大豆ホモジネートを必要とあれば更に加水分解した後、酵素の至適温度まで加温しpHを至適値に調整し酵素を加えてインキュベートする。次いで必要に応じて中和した後、酵素を失活させて加水分解液を得る。その加水分解物を濾紙およびセライトなどを用いて濾過することによって不溶性成分を除去し、その得られた濾液をセロファンなどの半透膜を用いて適当な溶媒(例えば、水、トリス-塩酸緩衝液、リン酸緩衝液などの中性の緩衝液など)中で十分に透析し、その濾液中の成分で半透膜を通過した成分を含む溶液を強酸性陽

4

イオン交換樹脂(例えば、ダウケミカル社製のDowex 50Wなど)にかけ、その吸着溶出分画からアンジオテンシン変換酵素(以下、ACEと略す)阻害活性を有する成分を含有する分画を得、その得られたACE阻害活性分画をゲル濾過(例えば、ファルマシア製のSephadex G-25など)によって分画し、その得られたACE阻害活性分画を陽イオン交換ゲル濾過(例えば、ファルマシア社製のSP-Sephadex C-25など)によって分画し、その得られたACE阻害活性分画をさらに逆相HPLC(逆相高速液体クロマトグラフィー)によって分画することによって行うことができる。

【0008】本発明の新規なテトラペプチド、ペンタペプチドの製法において用いるマメ科植物としては、本発明の目的を達成できる限りいかなるマメ科植物を用いても良いが、好ましくは大豆を用いるのが良い。以上のようにして得られた本発明の新規なテトラペプチド、ペンタペプチドは、静脈内へ繰り返し投与しても抗体産生を惹起せず、また、アナフィラキシーショックを起こさない。また、本発明の新規なテトラペプチド、ペンタペプチドはL-アミノ酸のみの配列構造からなり、その分子サイズからみて、投与後、生体内のプロテアーゼにより分解されることなく、すみやかに腸管吸収され、その血圧降下作用を発揮するため毒性は極めて低く、安全性は極めて高い(LD₅₀>5000kg/kg:ラット経口投与)。本発明に係る新規なテトラペプチド、ペンタペプチドは、通常用いられる賦形剤等の添加物を用いて注射剤、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等に調整することができる。投与方法としては、通常は、ACEを有している哺乳類(例えば、ヒト、イヌ、ラット等)に注射すること、あるいは経口投与することがあげられる。投与量は、例えば、動物体重1kg当りこのテトラペプチド、ペンタペプチドを0.01~10mgの量である。投与回数は、通常1日1~4回程度であるが、投与経路によって、適宜、調整することができる。本発明に係る新規なテトラペプチド、ペンタペプチドは優れたアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有し、血圧降下作用、ブラジキニン不活化抑制作用を示す。したがって、本態性高血圧、腎性高血圧、副腎性高血圧等の高血圧症の予防、治療剤、これらの疾患の診断剤や各種の病態において用いられる血圧降下剤として有用であり、更にうつ血性心不全に対する臓器循環の正常化と長期予後の改善(延命効果)作用を有し、心不全の治療剤として有用である。

【実施例】以下に実施例として、製造例および試験例を記載し、本発明を更に詳細に説明する。

【0009】製造例1

【新規なテトラペプチド、ペンタペプチドの大豆からの製造】大豆200gに脱イオン水1Lを加え、ホモジナイズした後、1N塩酸にてpHを2.0に調整し、ペプ

シン(メルク社製、酵素番号EC3.4.23.1)10gを添加し、37℃20時間攪拌しながら加水分解を行った。分解反応液を直ちに限外濾過膜(アミコン社製、YM10型、φ76mm)に通過させ、通過液をDowex 50W×4 [H⁺] カラム(φ4.5×15cm)に加えた。そのカラムを脱イオン水で十分洗浄した後、2N水酸化アンモニウム液2Lを用いて溶出した。減圧濾過によりアンモニアを除去し、濃縮液40mlを得た。この濃縮液4mlを予め脱イオンで緩衝化したSephadex G-25(φ2.5×150cm)に負荷し、流速30ml/hr、各分画量8.6mlでゲル濾過を行った。ゲル濾過を繰り返して大量分取したACE阻害活性の高い分画を集め凍結乾燥してペプチド粉末とした。このペプチド粉末3gを20mlの脱イオン水に溶解後、予め、脱イオン水で緩衝化したSP-Sephadex C-25 [H⁺] カラム(φ1.5×47.2cm)に負荷し、脱イオン水1Lから3%塩化ナトリウム液1Lの濃度勾配法を行い、流速3ml/hr、各分画10.0mlでクロマトグラフィーを行った。その結果は図1に示すとおりである。上記クロマトグラフ中、分画番号39~47のACE阻害活性分画を集めて凍結乾燥して精製ペプチド粉末を得た。この精製ペプチド粉末20mgを60μlの脱イオン水に溶解した後、HPLCを行った。カラムとしては野村化学社製Develosil ODS-5(4.5mmID×25cmL)を使用し、移動相としては0.05%トリフルオロ酢酸(以下TFAと略記する。)から25%アセトニトリル/0.05%TFAの濃度勾配法を行い、流速1.0ml/min、検出波長220nmでクロマトグラフィーを行い、ACE阻害作用を有するテトラペプチド、ペンタペプチドを得た。その結果は図2に示すとおりであり、3種類のテトラペプチド、5種類のペンタペプチドの溶出時間は表1のとおりである。

【0010】このようにして得られたACE阻害作用を有するテトラペプチド、ペンタペプチドのアミノ酸配列は、アブライドバイオシステム社製のプロテインシーケンサー477A型を用いて決定された。その結果、3種類のテトラペプチド、5種類のペンタペプチドはそれぞれ、
次式; Gln-Val-Val-Phe, Ile-Thr-Pro-Leu, Val-Val-Phe-Asp,
Gly-Asp-Ala-Pro-Asn, Ile-Val-Phe-Asp-Ala,
Val-Gln-Val-Val-Phe, Gly-Glu-Leu-Phe-Glu,
Val-Thr-Val-Pro-Gln
で示される1体のアミノ酸残基からなる配列を有するテトラペプチド、ペンタペプチドであることが確認された。新規3種類のテトラペプチド、5種類のペンタペ

チドをマスマスペクトル(FAB-MS)により分析した結果、アミノ酸配列およびアミノ酸組成が前記式で示したアミノ酸配列構造を有するテトラペプチド、ペンタペプチドであることが確認された。このマスマスペクトルの結果は表1に示すとおりである。精製して得られた本発明に係わる大豆由来テトラペプチド3種類、ペンタペプチド5種類より成る分画は、以下に示す試験によって薬理効果が確認された。

【0011】試験例1

10 [ACE阻害活性測定法] ACE(シグマ社製、酵素番号EC3.4.15.1)2.5mU、合成基質Hippuryl-L-his-tidy-L-leucine(ペプチド研究所製)12.5mMを用いLiebermanの測定法を改良した山本等の方法(日胸疾会誌、18、297-302(1989))に準じて測定した。すなわち、生成した馬尿酸を酢酸エチルにて抽出し、225nmの吸光度で測定した。被検液での吸光度をEs、被検液の代わりに緩衝液を加えた時の値をEc、予め反応停止液を加えて反応させた時の値をEbとして次式から阻害率を求めた。

$$\text{阻害率}(\%) = (Ec - Es) / (Ec - Eb) \times 100$$

ACE阻害剤の阻害活性Ics₅₀値は、ACEの酵素活性を50%(阻害率)阻害するために必要な試料の濃度(N)で示した。本発明に係わる大豆由来新規3種類のテトラペプチド、5種類のペンタペプチドの牛肺血清ACEに対する阻害活性(Ics₅₀値)は表1に示すとおりである。

【0012】試験例2

30 [新規なテトラペプチド、ペンタペプチドの高血圧自然発症ラットへ投与時の降圧効果]

I. 実験材料

前記製造例1で得られた精製ペプチド粉末。すなわち、大豆由来テトラペプチド3種類、ペンタペプチド5種類より成る分画(SP-2分画)粉末を用いた。

II. 実験方法

実験動物は日本チャールズ・リバー社(株)より15週令雄性高血圧自然発症ラット(以下、SHRと略記する。)を購入し、1週間の予備飼育後、収縮期血圧が160mmHg以上(体重280~330g)の動物6匹1群として用いた。ラットは、室温23±2℃、湿度55±10%および12時間明暗(午前6時~午後6時点灯)に調整された飼育室でステンレスワイヤー製ラット用個別ケージに1匹ずつ収容し飼育した。飼料はオリエンタル酵母工場(株)製MF粉末飼料を、飲水は自家揚水(水道水質基準適合)をそれぞれ自由に摂取させた。ラットは4群(1群6匹)に分け、第1群には対照として蒸留水を体重100gあたり0.5mlの割合で強制経口投与した、第2群には大豆由来テトラペプチド、ペ

gの用量を蒸留水で調製し、体重100gあたり0.5mlの割合で強制経口投与し、第3群にはテトラペプチド、ペンタペプチドの粉末（SP-2分画粉末）2.0g/kg、第4群にはテトラペプチド、ペンタペプチドの粉末（SP-2分画粉末）4.0g/kgの用量を、第2群と同様に強制経口投与した。

【0013】 血圧は非観血的尾動脈血圧測定装置（（株）理研開発製、PS-100）を用いtail-cuff法により、投与前、投与後30分、1時間、2時間、4時間および6時間の血圧および心拍数を測定した。血圧は連続3回測定し、その最高値と最低値の差が10mmHg以内の場合、その3回の平均血圧値を求めた。差が11mmHg以上の場合にはさらに2回測定し、最高値および最低値を除き3回の平均血圧値を求めた。また、平均心拍数は平均血圧値を算出したときの測定値を用いて求めた。SHRを用いて大豆由来テトラペプチ*

*ド、ペンタペプチドの粉末（SP-2分画）1.0、2.0および4.0g/kgを単回経口投与した時の、血圧値および心拍数への作用についての結果は図3～5に示すとおりである。以上の試験の結果、本発明に係わる大豆由来テトラペプチド3種類、ペンタペプチド5種類より成る分画は、ACE阻害活性を有し、in vivoにおいても有意な血圧降下作用を示すことが確認された。したがって、本発明に係わる大豆由来テトラペプチド3種類、ペンタペプチド5種類は高血圧症の治療または予防薬として有用である。なお、本発明に係わる大豆由来テトラペプチド3種類、ペンタペプチド5種類は、構造的にそのアミノ酸配列を部分構造とするペプチドにおいて、構造中に採用することもできる。

【0014】

【表1】

| 溶出時間 (分) | アミノ酸配列 | ACE阻害活性 (IC ₅₀ , ×10 ⁻⁶ M) | 分子量 (FAB-MS, MH ⁺) |
|-------------|---------------------|---|-----------------------------------|
| 34.2 | Val-Thr-Val-Pro-Gln | 63 | 543 |
| 37.1 | Val-Val-Phe-Asp | 39 | 479 |
| 44.7 | Gly-Glu-Leu-Phe-Glu | 23 | 594 |
| 47.4 | Ile-Thr-Pro-Leu | 52 | 443 |
| 52.5 | Gln-Val-Val-Phe | 46 | 492 |
| 67.3 | Val-Gln-Val-Val-Phe | 34 | 591 |
| 81.2 | Ile-Val-Phe-Asp-Ala | 41 | 564 |
| 84.8 | Gly-Asp-Ala-Pro-Asn | 28 | 473 |

本発明に係わる大豆由来テトラペプチド、ペンタペプチドのHPLCにおける溶出時間、アミノ酸配列、阻害活性および分子量。

【0015】

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明に係わる大豆由来テトラペプチド、ペンタペプチドの、製造例1におけるSP-Sephadex C-25 (H⁺) カラムクロマトグラフィーによるACE阻害ペプチドの分離精製の結果を示す図である。

【図2】 本発明に係わる大豆由来テトラペプチド、ペンタペプチドの、製造例1における逆相HPLCによるACE阻害ペプチドの分離精製の結果を示す図である。

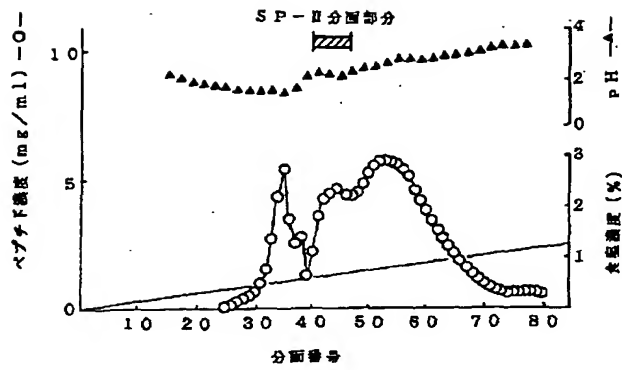
【図3】 本発明に係わる大豆由来テトラペプチド、ペンタペプチドの、製造例1で得られた3種類のテトラペ

チド、5種類のペンタペプチドの粉末（SP-2分画）をSHRに投与した場合の血圧値の経時的変化を示す図である。

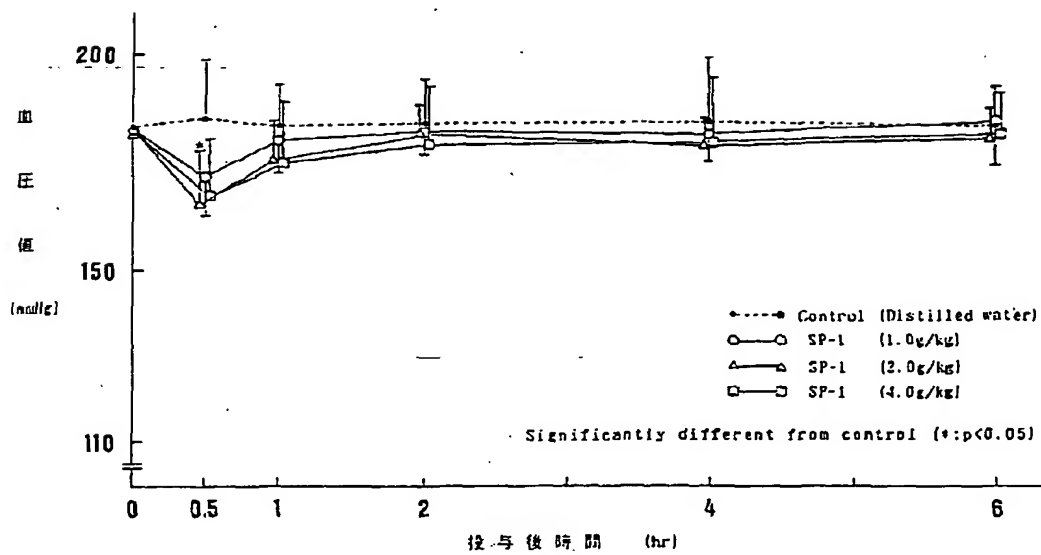
【図4】 本発明に係わる大豆由来テトラペプチド、ペンタペプチドの、製造例1で得られた3種類のテトラペプチド、5種類のペンタペプチドの粉末（SP-2分画）をSHRに投与した場合の血圧値（差圧）の経時的変化を示す図である。

【図5】 本発明に係わる大豆由来テトラペプチド、ペンタペプチドの、製造例1で得られた3種類のテトラペプチド、5種類のペンタペプチドの粉末（SP-2分画）をSHRに投与した場合の心拍数の経時的変化を示す図である。

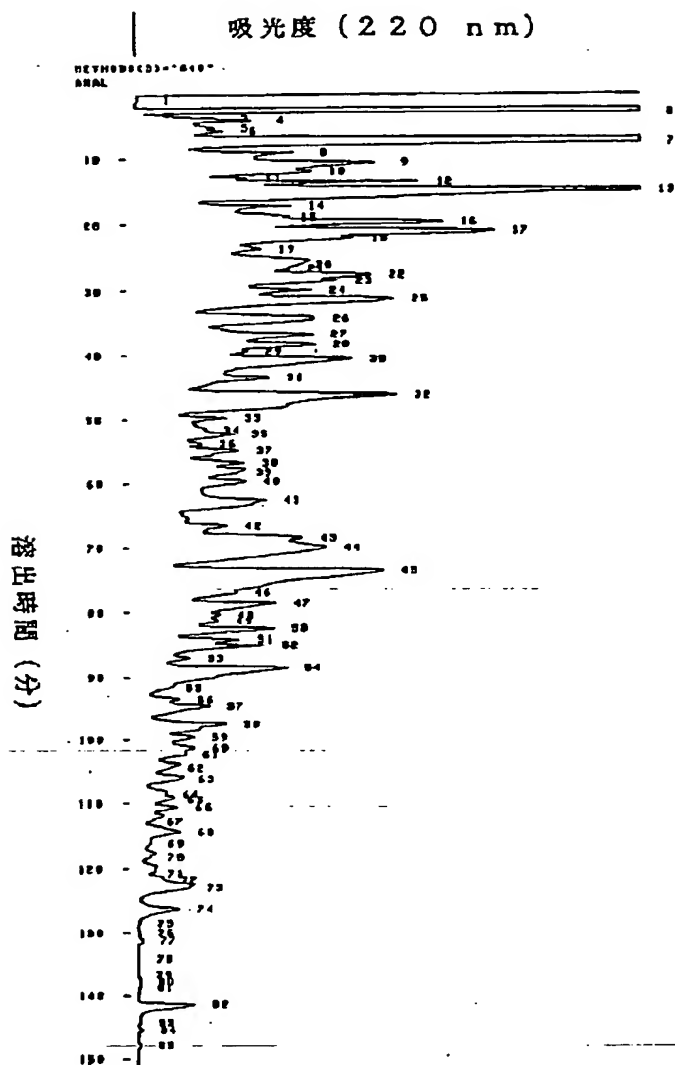
【図1】



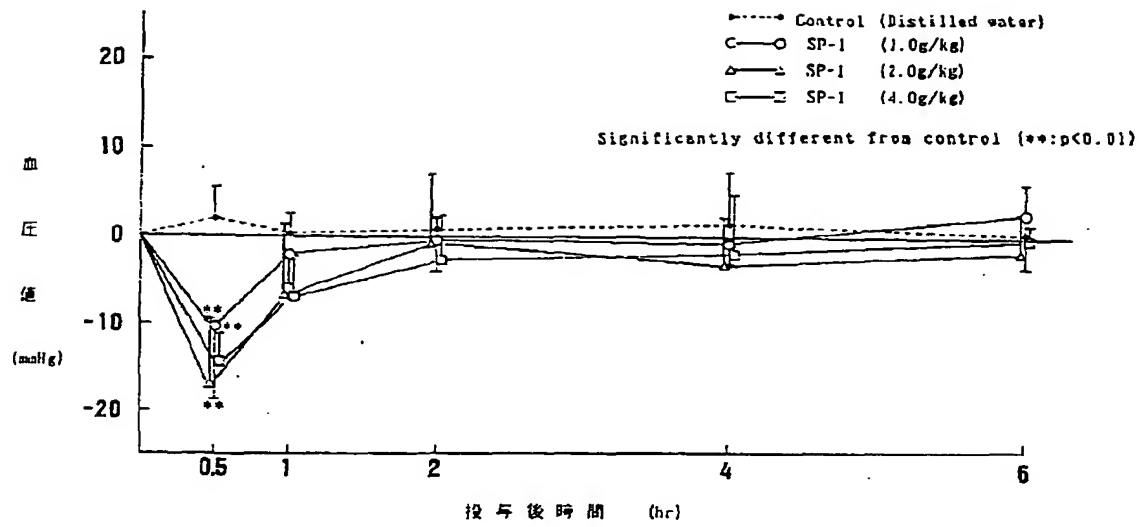
【図3】



吸光度 (220 nm)



【図4】



【図5】

